

جداسازی و بهینه سازی باکتری های تولید کننده آنزیم آسپارژیناز در بستر

جامد با استفاده از روش Plackett-Burman

سپها سیدی ابهری^{۱،۲}، مهدی شهریار نور^{۱*}، معصومه انوری^۲، فرید عزیزی جلیلیان^۳

^۱گروه زیست شناسی- میکروبیولوژی، پردیس علوم و تحقیقات گیلان، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران؛ ^۲گروه زیست شناسی- میکروبیولوژی،

واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران؛ ^۳گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۱۴

چکیده:

زمینه و هدف: این تحقیق به روش تخمیر در بستر جامد به منظور بررسی انواع بسترهای جامد در تولید آنزیم آسپارژیناز توسط سویه ی جداسازی شده از منطقه لاکان استان گیلان از جنس باسیلوس انجام گردید.

روش بررسی: در این بررسی تجربی جهت جداسازی باکتری های تولید کننده ال آسپارژیناز از محیط کشت M9 استفاده شد. جهت غربالگری در بستر جامد از بسترهای مختلف سبوس برنج، ساقه برنج، سبوس گندم و ساقه گندم به عنوان منابع کربن و همچنین از عصاره مخمر، پیتون، آسپارژین، تریپتون به عنوان منابع نیتروژن استفاده شد. جهت بهینه سازی محیط کشت و بررسی اثر منابع کربن و نیتروژن بر میزان تولید آنزیم آسپارژیناز با استفاده از روش Plackett-Burman تعداد ۱۲ آزمایش در ۲ سطح طراحی شد؛ سپس انواع بسترهای جامد با تغییر فاکتورهای تأثیرگذار در تولید آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: بهترین بستر جامد، بستر سبوس برنج و بهترین منبع ازت آسپارژین، بیشترین تأثیر را در افزایش تولید آنزیم از خود نشان دادند. بهترین شرایط تولید آنزیم به دست آمده در بستر جامد در میزان غلظت سبوس برنج ۱/۵٪ وزنی/ وزنی و میزان غلظت آسپارژین ۰/۵٪ وزنی/ وزنی و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و به مدت زمان ۷۲ ساعت به میزان ۶۹/۲۴ واحد آنزیم بر گرم مشاهده گردید.

نتیجه گیری: در این تحقیق میزان تولید آنزیم با استفاده از سبوس برنج به عنوان منبع کربن در بستر جامد پس از بهینه سازی نسبت به شرایط بهینه سازی شده افزایش قابل ملاحظه داشت.

واژه های کلیدی: بهینه سازی، آنزیم آسپارژیناز، ضایعات سبوس برنج، تخمیر در بستر جامد.

مقدمه:

آنزیم ال آسپارژیناز واکنش تبدیل ال آسپارژین را به ال آسپارتیک اسید و آمونیاک کاتالیز می کند. سمیت انتخابی روی سلول های لوسمیک بدون تأثیر گذاشتن روی سلول های سالم به دلیل کاهش موثر سطح ال آسپارژین در پلاسما در بدن ایجاد می شود که منجر به جلوگیری از سنتز پروتئین و در نهایت توقف سنتز DNA و RNA می شود که القا آپوپتوز در سلول مبتلا به لوسمی را در پی خواهد داشت (۲). آنزیم ال آسپارژیناز در بسیاری از بافت های جانوری، گیاهی و باکتری ها و در سرم گروه های خاصی از جوندگان یافت

آنزیم ال آسپارژیناز به دلیل استفاده در درمان لنفوبلاستوماهای بدخیم به ویژه لوسمی لنفوبلاستیک حاد و لنفوسارکوما و نیز جلوگیری از تشکیل اکریلامیدها در مواد غذایی سرخ شده در حرارت بالا توانسته است، در صنعت رو به رشد استفاده از آنزیم های میکروبی از جایگاه مناسبی برخوردار شود. عملکرد ضد سرطانی این آنزیم مربوط به احیا ال آسپارژین بوده و دلیل این امر در ناتوانی سلول های توموری در سنتز آسپارژین می باشد که به این ترتیب به صورت انتخابی فقط سلول های توموری کشته می شوند (۱).

روش بررسی:

جهت جداسازی باکتری های تولید کننده آنزیم ال آسپارژیناز نمونه برداری از عمق ۱۵ سانتی متری خاک صورت گرفت و در ظروف در بسته استریل به آزمایشگاه انتقال داده شد. ۱ گرم از نمونه خاک تهیه شده در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل ریخته شد و برای مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. از نمونه ها رقت های سریالی تهیه شد. به منظور جداسازی و کشت باکتری های تولید کننده ال آسپارژیناز از محیط کشت M9 استفاده شد که مواد مورد استفاده در تهیه یک لیتر از این محیط شامل Na_2HPO_4 ۶ گرم، KH_2PO_4 ۳ گرم، NaCl ۰/۵ گرم، L-asparagin ۵ گرم، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1M) ۲ میلی لیتر، $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1M) ۱ میلی لیتر، Glucose stock ۲۰٪، Phenol red ۰/۳ میلی لیتر، Agar ۲۰ گرم، Phenol red ۰/۳ میلی لیتر در یک لیتر محلول می باشد (۵). از هر یک از نمونه های تهیه شده به روش رقت های سریالی ۱ میلی لیتر نمونه برداشته و در ۱۰ لوله حاوی محیط کشت استریل ریخته می شود و پس از vortex در داخل plate ها کشت داده شد. پس از حدود ۱۵ دقیقه محیط کشت به دلیل وجود آگار به حالت جامد درآمده و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه می گردد.

کلنی های صورتی رنگ ایجاد شده در پلیت ها که نشان دهنده رشد باکتری های تولید کننده ال آسپارژیناز می باشد. با لوپ به پلیت های حاوی محیط M9 انتقال و به صورت خطی کشت داده می شوند. کلنی های صورتی رنگ بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون مشاهده شد و به این ترتیب باکتری های تولید کننده آنزیم جداسازی شدند.

شناسایی گونه ها بر اساس بررسی لام میکروسکوپی، رنگ آمیزی گرم و روش مولکولی انجام گرفت. استخراج DNA با کیت شرکت Fermentase صورت گرفت. PCR با برنامه زمانی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ سیکل شامل

می شود؛ ولی در انسان وجود ندارد. باکتری های متعددی قادر به تولید ال آسپارژیناز هستند که از جمله می توان به *E.coli*، *Erwinia carotovora*، *Basilussubtilis*، اشاره نمود. در میان اکتینومایست های تولید کننده آسپارژیناز می توان به *Nocardia sp*، *Streptomyces griseus*، *Saccharomyces cerevisiae* اشاره کرد. در میان مخمرها *Saccharomyces cerevisiae* قادر به تولید آنزیم ال آسپارژیناز می باشد. علاوه بر این گونه های قارچی مانند *Aspergillus tereus* و *Aspergillus tamari* و برخی دیگر از قارچ های رشته ای نیز تولید کننده این آنزیم هستند (۳). در سیستم تخمیر به روش جامد، ضایعات کشاورزی به عنوان بهترین سوبسترا مطرح هستند. از سوبستراهای مختلفی برای کشت میکروارگانیسم ها جهت تولید آنزیم به کار گرفته شده اند. انتخاب سوبسترا برای تولید آنزیم در فرایند تخمیر در بستر جامد وابسته به فاکتورهای متعدد از قبیل قیمت و قابلیت دسترسی سوبسترا است (۴).

در فرایند تخمیر در بستر جامد، سوبسترا جامد نه تنها به عنوان ماده غذایی برای رشد میکروارگانیسم ها بلکه به عنوان جایگاهی برای اتصال سلول است. سوبسترای که تمام نیازهای غذایی مورد نیاز میکروارگانیسم ها را برای رشد فراهم می کند به عنوان سوبسترای ایده ال مطرح می شود (۴). تولید این آنزیم با استفاده از روش تخمیر در بستر جامد انجام می شود. در سیستم تخمیر به روش جامد، ضایعات کشاورزی به عنوان بهترین سوبسترا مطرح هستند. در این تحقیق جداسازی و بهینه سازی تولید آنزیم با استفاده از روش Plackett-Burman انجام شد. استفاده از طراحی آزمایش Plackett-Burman به عنوان یک ابزار ارزشمند برای غربالگری اولیه اثرات عوامل مختلف با تعداد کم آزمایشات قابل اطمینان بوده و این تکنیک نشان دهنده تأثیر هر فاکتور در فرایند تولید آنزیم در طی فرایند بهینه سازی می باشد. در این روش فاکتورهای تأثیرگذار بر تولید آنزیم آسپارژیناز در بستر جامد، به منظور دستیابی به حداکثر تولید آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت.

۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۱ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۸۰ ثانیه و یک سیکل ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از از پرایمرهای 16s rRNA با نام 16s1500F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG و 16s1500R: AAGGAGGTGWTCCARCC انجام شد. پس از پایان واکنش تکثیر، مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه را بر روی ژل آگارز ۱٪ برده تا کیفیت قطعات ژنی پس از تکثیر مورد ارزیابی قرار گیرند. باند مورد نظر تعیین توالی گردید و صحت آن مورد تأیید قرار گرفت و پس از دریافت نتیجه تعیین توالی در سایت NCBI بر اساس تشابه توالی ها با ابزار BLAST مورد بررسی قرار گرفت (۶).

از محیط کشت M9 بدون فنل رد و آگار به عنوان محیط پیش کشت استفاده گردید. پس از تهیه پیش کشت، با لوپ یک کلنی از باکتری هایی که مدت ۲۴ ساعت از کشت آن ها در محیط M9 سپری شده است، برداشته و داخل محیط مایع کشت داده و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می دهیم (۷).

جهت غربالگری در بستر جامد از بسترهای مختلف به عنوان منابع کربن و ازت متفاوت استفاده گردید. منابع کربن مورد استفاده شامل: سبوس برنج، ساقه برنج، سبوس گندم و ساقه گندم و منابع نیتروژن نیز شامل عصاره مخمر، پپتون، آسپارژین، تریپتون بودند. به نحوی که در غربالگری بستر جامد از هیچ گونه منبع کربن یا ازت کمی استفاده نشد و فقط از بافر و میکروارگانسیم استفاده گردید تا بهترین منبع کربن و ازت مورد استفاده توسط میکروارگانسیم تعیین گردد (۸). بدین منظور مقادیر انتخابی از هر سوبسترای کاملاً ریز شده به ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری افزوده و سپس ۲ میلی لیتر از مایه تلقیح که ۲۴ ساعت از تهیه آن گذشته به بسترها اضافه گردید و برای مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از ۴۸ ساعت، آنزیم را استخراج و تولید آنزیم ارزیابی و سنجش گردید.

جهت استخراج آنزیم، محتوای هر ارلن پس از سپری کردن زمان ۴۸ ساعت، ۴۵ میلی لیتر به آن بافر فسفات افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد و با کاغذ صافی فیلتر گردید. عصاره حاصل از فیلتراسیون به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید و از سوسپانسیون رویی به عنوان محلول جهت سنجش فعالیت آنزیم استفاده گردید. اساس روش تعیین فعالیت آسپارژیناز بر مبنای اندازه گیری آمونیاک آزاد شده به وسیله هیدولیز آسپارژین موجود در نمونه ها، با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر می باشد. این روش به نام روش direct Nesslerization موسوم است. برای این کار ابتدا باید منحنی استاندارد آمونیاک را رسم نمود و بر مبنای آن غلظت آمونیاک آزاد شده را محاسبه نمود (۹،۷).

جهت سنجش فعالیت آنزیم به هر لوله آزمایش ابتدا ۱ میلی لیتر محلول Tris ۵۰ میلی مولار (۰/۰۵ مولار) با ۸/۶ pH: ریخته و سپس ۰/۱ میلی لیتر آسپارژین ۱۸۹ میلی مولار و ۰/۹ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی لیتر از محلول آنزیمی به آن اضافه می نمایم و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، گرمخانه گذاری می کنیم؛ سپس ۰/۱ میلی لیتر معرف ۱/۵ مولار تری کلرواستیک اسید (TCA) به آن اضافه می نمایم (با افزودن TCA) واکنش آنزیمی پایان می پذیرد. در پایان ۲/۳۰ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر معرف نسلر به آن افزوده و جذب های نوری در ۴۳۶ نانومتر مورد ارزیابی قرار می گیرد. ۱ واحد فعالیت آنزیمی مقدار آنزیمی است که ۱ میکرومول آمونیاک را در مدت زمان ۱ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد آزاد می نماید. مقدار آمونیاک حاصله بر اساس منحنی استاندارد آمونیاک تعیین گردید (۸).

بهینه سازی محیط کشت تولید آسپارژیناز با طراحی آزمایش Plackett-Burman انجام شد. طراحی Plackett-Burman روش مؤثری برای غربالگری پارامترهای فیزیکی- شیمیایی در میان متغیرهای زیاد

فرایند به منظور یافتن ترکیبات بهینه محیط کشت و بهبود شرایط تولید است. برای این منظور ۴ نوع منبع کربن (سبوس برنج، ساقه برنج، سبوس گندم و ساقه گندم) و ۴ نوع منبع نیتروژن (پیتون، عصاره مخمر، آسپارژین، تریپتون) انتخاب شدند. جهت بهینه سازی محیط کشت و بررسی اثر منابع کربن و نیتروژن بر میزان تولید آنزیم آسپارژیناز با استفاده از

روش Plackett-Burman تعداد ۱۲ آزمایش در ۲ سطح طراحی شد. در جدول شماره ۱ متغیرهای مستقل فرایند و مقادیر آن ها نشان داده شده است. به منظور آنالیز آماری از نرم افزار Minitab 16 برای بررسی معنی دار بودن یا نبودن اثر فاکتورهای مورد آزمایش استفاده گردید و تمامی آزمایش ها به تعداد ۳ مرتبه تکرار گردید.

جدول شماره ۱: طراحی Plackett-Burman برای ۸ متغیر کد شده با فعالیت آنزیم آسپارژیناز

شماره آزمایش	سبوس برنج	ساقه برنج	سبوس گندم	کاه گندم	عصاره مخمر	پیتون	آسپارژین	تریپتون	فعالیت آسپارژیناز (واحد آنزیم بر گرم)
۱	۱	۱	۰/۵	۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۵	۲۳/۲۳
۲	۱	۰/۵	۱	۰/۵	۰/۱	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۲۶/۲۸۳
۳	۱	۱	۰/۵	۱	۰/۵	۰/۱	۰/۵	۰/۱	۲۸/۸
۴	۰/۵	۱	۱	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۱۶/۲۱
۵	۱	۱	۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۰/۵	۱۹/۳۴
۶	۰/۵	۱	۱	۱	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۲۷/۰۵
۷	۰/۵	۱	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۲۵/۱۲
۸	۱	۰/۵	۱	۱	۰/۱	۰/۵	۰/۱	۰/۱	۲۴/۷۱
۹	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۱۸/۳۲
۱۰	۱	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۲۶/۱۵
۱۱	۰/۵	۰/۵	۱	۱	۰/۵	۰/۱	۰/۵	۰/۵	۲۴/۱۸
۱۲	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۱	۰/۵	۰/۵	۰/۱	۰/۵	۱۶/۰۵

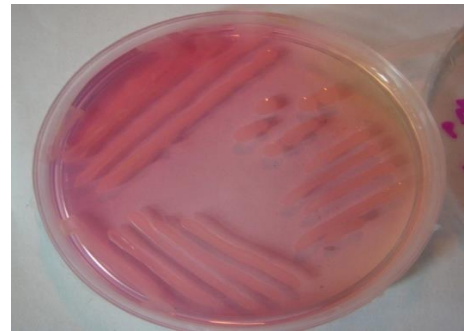
جهت بررسی اثر پارامترهای مختلف بر تولید آنزیم در بستر جامد پس از انجام غربالگری بستر جامد با توجه به بهترین منبع کربن و نیتروژن، میزان تولید آنزیم آسپارژیناز در میزان غلظت های مختلف سبوس برنج (۲/۱، ۲، ۵/۰، ۱، ۵/۵) و وزنی / وزنی و میزان غلظت های مختلف آسپارژین (۲/۱، ۰، ۳/۱، ۵/۰، ۷/۰، ۹/۰، ۰/۰، ۰/۰، ۰/۰، ۰/۰) و دوره های زمانی (۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ ساعت) و دمای (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ درجه سانتی گراد) مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها:

بر طبق نتایج به دست آمده، سویه های ایزوله شده قادر به تولید آنزیم آسپارژیناز، پس از رشد بر روی محیط کشت M9، هاله های صورتی رنگ تشکیل

می دهند. فنول رد در pH اسیدی، زرد رنگ بوده و در حالت بازی به رنگ صورتی دیده می شود و هاله های صورتی رنگ، اطراف کلنی های میکروبی تولید کننده آسپارژیناز ایجاد می شود (تصویر شماره ۱- الف). از میان ۱۰ میکروارگانیسم جداسازی شده از خاک، ۶ نمونه توانایی بالایی در تولید آنزیم آسپارژیناز از خود نشان دادند. میزان تولید بر اساس فعالیت آنزیم بررسی گردید. از میان سویه های جدا شده بهترین سویه از نظر تولید آنزیم انتخاب و جهت شناسایی مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. سویه مورد نظر باکتری گرم مثبت *Bacillus thuringiensis* بوده و همچنین توالی مورد نظر به دست آمده از واکنش PCR ۱۴۸۴bp بود که از نظر همولوژی با سایر توالی های ثبت شده در پایگاه NCBI مورد مقایسه قرار گرفت. در تمام موارد

همولوژی کمتر از ۱۰۰٪ بود که احتمال جدید بودن سویه ها را نشان می دهد (تصویر شماره ۱-ب).



(الف)

Bacillus thuringiensis strain
Bacillus thuringiensis (EU429671) (99%)
Bacillus thuringiensis (CP007607)
Bacillus thuringiensis (CP004870)
Bacillus cereus (KJ722447)
Bacillus cereus (KF444371)
Bacillus cereus (DQ122123)
Bacillus cereus (AJ809498)
Bacillus anthracis (CP008854)
Bacillus anthracis (CP008853)
Bacillus anthracis (CP008752)
Bacillus anthracis (CP007666)
Bacillus mycoides (JF418154)
Bacillus bombysepticus (CP007512)

(ب)

تصویر شماره ۱: (الف) باکتری های جدا شده در محیط کشت M9؛ (ب) نتایج بلاست ۱۳ باکتری تولید کننده آسپارژیناز

در این تحقیق ترکیبات موثر محیط کشت شامل منابع کربن و نیتروژن جهت افزایش تولید آنزیم آسپارژیناز با طراحی آزمایش Plackett-Burman شناسایی و انتخاب گردید (جدول شماره ۱). استفاده از طراحی آزمایش Plackett-Burman به عنوان یک ابزار ارزشمند برای غربالگری اولیه اثرات عوامل مختلف با تعداد کم آزمایشات قابل اطمینان بوده و این تکنیک نشان دهنده تأثیر هر فاکتور در فرایند تولید آنزیم در طی فرایند بهینه سازی می باشد. بررسی نتیجه آزمایشات نشان داد که فعالیت آنزیم آسپارژیناز در محدوده ۱۶/۰۵ واحد آنزیم بر گرم تا ۲۷/۰۵ واحد آنزیم بر گرم متغیر می باشد.

$$Y = +22/95 + 1/8 \cdot X_1 + 1/0.5 X_2 - 1/17 X_3 + 3/31 X_4$$

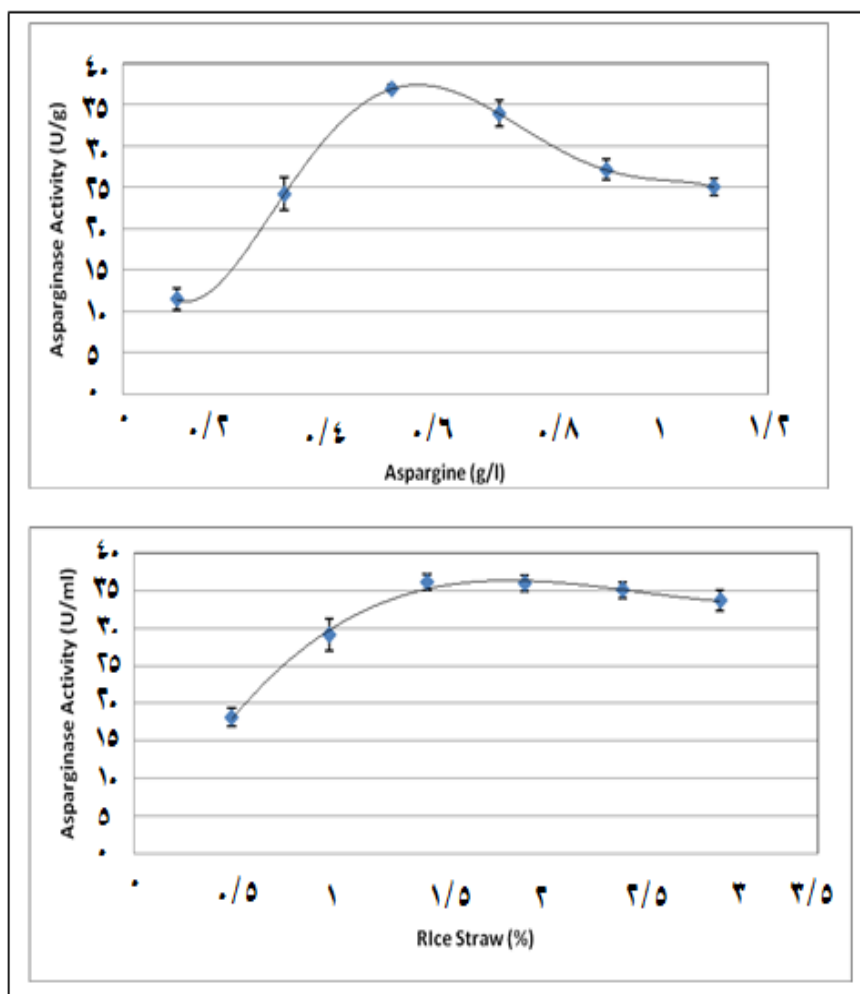
(X_1 = عصاره مخمر، X_2 = سبوس گندم، X_3 = سبوس برنج، X_4 = آسپارژین)

صرف نظر از متغیرهایی که معنی دار نبودند، معادله برای تولید آنزیم آسپارژیناز به صورت زیر بیان می شود:

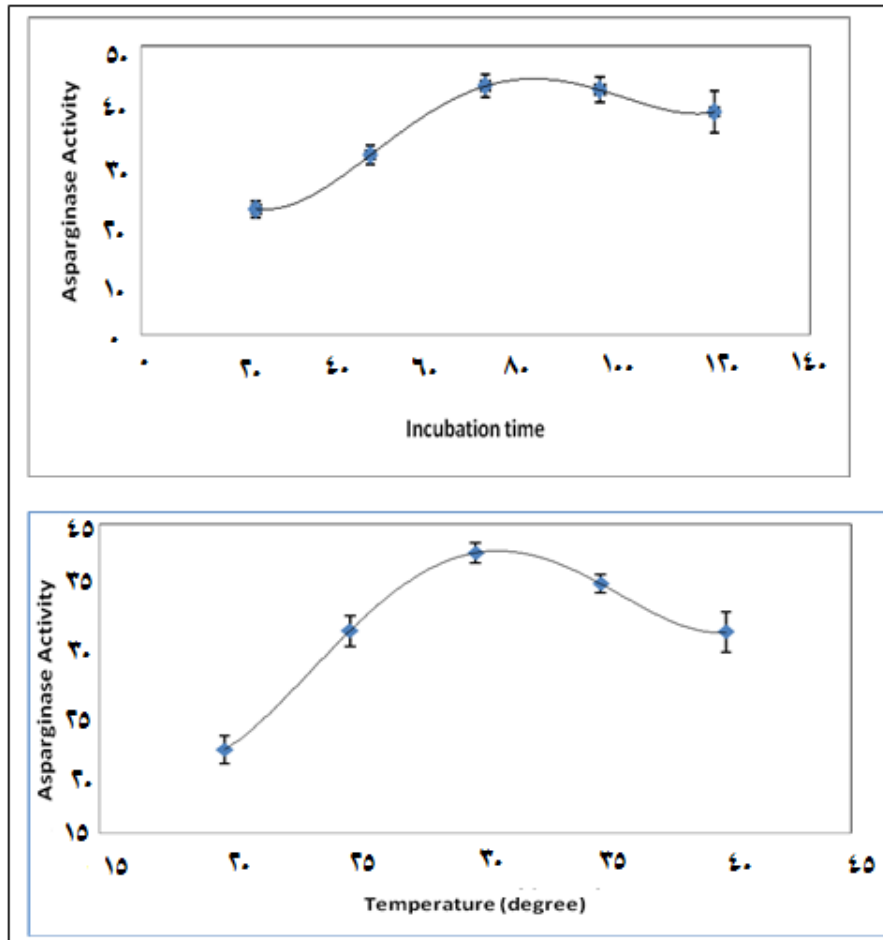
آنالیز رگرسیون ضرایب و P مربوط به ۸ پارامتر نشان داد که از بین پارامترهای مختلف (سبوس برنج، ساقه برنج، سبوس گندم، ساقه گندم، آسپارژین، عصاره مخمر، تریپتون، پپتون) مورد آزمایش، سبوس برنج به عنوان بهترین منبع کربن و آسپارژین بهترین منبع نیتروژن می باشد ($P > 0.05$). جدول شماره ۲ آنالیز واریانس (ANOVA) را طی طراحی به روش Plackett-Burman نشان می دهد؛ لذا این میزان آسپارژین و سبوس برنج جهت بررسی بهترین درصد در غلظت های مختلف به محیط اضافه شدند. بهترین زمان برای تولید آنزیم در نمودار شماره ۱- الف نشان داده شده است؛ همچنین میزان تولید آنزیم آسپارژیناز در زمان های مختلف انکوباسیون و دمای انکوبه کردن جهت به دست آوردن بهترین زمان و دما مورد بررسی قرار گرفتند که حداکثر تولید آنزیم ۷۲ ساعت پس از گرمخانه گذاری مشاهده شد (۴۳/۱۶ واحد آنزیم بر گرم) و پس از آن تولید کاهش یافت؛ همچنین نمودار شماره ۱- ب رابطه بین دما و میزان آنزیمی را نشان می دهد که بیشترین فعالیت آنزیمی در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد ۳۹/۱ واحد آنزیم بر گرم نشان داده شد و پس از آن تولید با کاهش همراه بود. در نمودار شماره ۲- الف تأثیر میزان غلظت آسپارژین بر فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت که بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در غلظت آسپارژین ۰/۵٪ وزنی/ وزنی ۳۷/۵ واحد آنزیم بر گرم و میزان غلظت تأثیرگذار سبوس برنج فعالیت آنزیمی ۳۶/۵ واحد آنزیم بر گرم با میزان غلظت سبوس برنج ۱/۵٪ وزنی/ وزنی مشاهده گردید (نمودار شماره ۲-ب).

جدول شماره ۲: نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) برای انتخاب منبع کربن و نیتروژن با روش طراحی Plackett-Burman در بستر جامد

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	مقدار P
ثابت	۲۰۵/۴۹	۸	۲۵/۶۹	۲۰/۳۱	۰/۰۱۵۵
سیوس برنج (وزنی / وزنی)	۳۸/۸۲	۱	۳۸/۸۲	۳۰/۶۹	۰/۰۱۱۶
ساقه برنج (وزنی / وزنی)	۱/۳۷	۱	۱/۳۷	۱/۰۸	۰/۳۷۴۳
سیوس گندم (وزنی / وزنی)	۰/۰۰۸۴۱	۱	۰/۰۰۸۴۱	۰/۰۰۹۸۹	۰/۹۸۰۶
ساقه گندم (وزنی / وزنی)	۱۳/۲۲	۱	۱۳/۲۲	۱۰/۴۵	۰/۰۴۸۱
عصاره مخمر (وزنی / وزنی)	۱۶/۲۹	۱	۱۶/۲۹	۱۲/۸۸	۰/۰۳۷۰
پیتون (وزنی / وزنی)	۰/۱۶	۱	۰/۱۶	۰/۱۳	۰/۷۴۳۷
آسپاراژین (وزنی / وزنی)	۱۳۱/۴۹	۱	۱۳۱/۴۹	۱۰۳/۹۶	۰/۰۰۲۰
تریپتون (وزنی / وزنی)	۴/۱۳	۱	۱۳/۴	۳/۲۶	۰/۱۶۸۶



نمودار شماره ۱: (الف) اثر زمان گرمخانه گذاری بر میزان تولید آنزیم آسپارژیناز؛ (ب) اثر دمای گرمخانه گذاری بر میزان تولید آنزیم آسپارژیناز



نمودار شماره ۲: (الف) اثر میزان غلظت آسپارژین بر تولید آنزیم آسپارژیناز؛ (ب) اثر میزان غلظت سبوس برنج بر تولید آنزیم آسپارژیناز

بحث:

به عنوان اجزا محیط کشت در تولید آنزیم است (۸). بررسی نتایج نشان داد، فعالیت آنزیم در بستر جامد در محدوده ۱۶/۰۵ واحد آنزیم بر گرم تا ۲۷/۰۵ واحد آنزیم بر گرم متغیر است. از بین پارامترهای مورد آزمایش سبوس برنج به عنوان بهترین منبع کربن و آسپارژین به عنوان بهترین منبع نیتروژن است. گزارشات متعدد حاکی از حداکثر تولید آنزیم در فواصل زمانی ۴۸ تا ۹۶ ساعت برای باکتری ها و ۱۴۴ تا ۲۱۶ ساعت برای قارچ ها است (۹). در حالی که نتایج این تحقیق نشان داد، بهترین دوره زمانی برای تولید آنزیم آسپارژیناز در ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری مشاهده شد. کم شدن میزان تولید با گذشت زمان می تواند به دلیل

تخمیر در بستر جامد تا حد زیادی از ماهیت و نوع سوبسترا تأثیر می پذیرد. در حال حاضر هزینه های تولید آنزیم ها بسیار بالا بوده و دستیابی و جایگزینی با سوبستراهای ارزان قیمت ضروری به نظر می رسد. در این تحقیق سوبسترای سبوس برنج برای تولید آنزیم آسپارژیناز مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات و بررسی های مختلف حاکی از آن است که سبوس برنج سوبسترای مناسبی برای تولید آنزیم ها در بستر جامد می باشد. رویکرد کلاسیک و سنتی بهینه سازی محیط فرایندی زمان بر بوده و نیاز به کار آزمایشگاهی و هزینه زیاد دارد. طراحی آزمایش Plackett-Burman ابزار با ارزشی برای ارزیابی سریع اثر فاکتورهای مختلف

چوب، آسپارژین و نمک طعام ۸ متغیری بودند که در روش پلاکت برمن مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج حاصل از آن تحقیق نشان داد که بیشترین میزان تولید آنزیم ۳۴/۷۵۸ واحد آنزیم بر گرم اندازه گیری شد (۶). نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که از بین ضایعات مختلف کشاورزی مورد مطالعه، سبوس برنج سوبسترایی مناسب برای تولید آسپارژیناز است. روش های آماری مورد استفاده در این تحقیق برای تولید آنزیم آسپارژیناز شامل طراحی Placket-Burman بود.

نتیجه گیری:

در این تحقیق میزان تولید آنزیم آسپارژیناز با استفاده از سبوس برنج به عنوان منبع کربن در بستر جامد پس از بهینه سازی به میزان ۲ برابر نسبت به بسترهای دیگر افزایش داشت. تولید آنزیم در بستر جامد در مقایسه با سایر مطالعات بیشتر بود و این نشان دهنده این است که سویه بومی جداسازی شده از منطقه لاکان استان گیلان توانایی بالایی در تولید آنزیم آسپارژیناز دارد. با توجه به نتایج حاصل از ویژگی آنزیم، استفاده از آن در تولید دارو در درمان سرطان و همچنین در صنایع غذایی است.

تشکر و قدردانی:

این تحقیق بخشی از نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد است و بدین وسیله از کلیه اساتید و همچنین کارکنان آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات گیلان و واحد رشت که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

دگرگونی ساختمان پروتئینی آنزیم تحت شرایط گرمخانه گذاری و یا کاهش مواد غذایی قابل دسترس توسط میکروارگانیسم باشد. در این تحقیق در بررسی تأثیر دما بر تولید آنزیم آسپارژیناز مشخص شد که بیشترین میزان تولید آنزیم در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد حاصل گردید. در حالی که Mishra بیشترین میزان تولید آنزیم را در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد برای *A.nigar* گزارش نمودند (۱۳). Narayana در حداکثر میزان تولید آنزیم را توسط *S.albidoflavous* در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد گزارش نمود (۱۴). علت کاهش میزان تولید با افزایش دما می تواند به دلیل کاهش رشد میکروب ها و همچنین غیر فعال شدن آنزیم ها و تغییر ماهیت آن ها باشد. از فاکتورهای مهم دیگر در میزان تولید آنزیم آسپارژیناز می توان در خصوص انتخاب بهترین منابع کربن و ازت اشاره نمود. یافته های حاصل از این تحقیق مانند نتایج سایر محققان نشان داد که باکتری ها و گونه های مختلف منابع ترجیحی متفاوتی بدین منظور دارند. در این تحقیق بیشترین میزان تولید آنزیم با استفاده از سبوس برنج با غلظت ۱/۵٪ وزنی/ وزنی، بیشترین میزان فعالیت آنزیمی ۳۶/۵ واحد آنزیم بر گرم را نشان داد؛ همچنین بیشترین فعالیت آنزیم آسپارژیناز در غلظت ۰/۵٪ وزنی/ وزنی آسپارژین به عنوان منبع ازت به میزان ۳۷/۵ واحد آنزیم بر گرم به دست آمد؛ همچنین در پژوهش انجام شده توسط Shukla و Mandal آسپارژین به عنوان منبع نیتروژن بیشترین میزان فعالیت آنزیمی را از خود نشان داد که این بیانگر این است که آسپارژین به عنوان یک القا کننده مناسب برای آنزیم آسپارژیناز عمل می نماید (۹). Thenmozhi و همکاران بهینه سازی تولید آسپارژیناز را با استفاده از باکتری *Bacillus cereus* مورد بررسی قرار دادند که عصاره مخمر، کنجاله سویا، گلوکز، سولفات منیزیم، فسفات پتاسیم، تراشه

منابع:

1. Friedman H. L-asparaginase induced immunosuppression: inhibition of bone marrow derived antibody precursor cells. Science. 1971; 174(4005): 139-41.

2. Sanson E, Jaskolski M. Structure, dynamics and electrostatics of the L-asparaginase catalytic centre: Implications for reaction mechanism. London: Department of Crystallography, Birkbeck College, London and Venus Internet Ltd. 2004; 690(4): 165-84.
3. Barbara K, Waldemar A, Kazimierz G, Adam P. Introduction to environmental microbiology. Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej. 2006; 690(9): 7-17.
4. Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Curr Sci. 1999; 77(1): 149-62.
5. Gulati R, Saxena RK, Gupta R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. Lett Appl Microbiol. 1997; 24(1): 23-6.
6. Thenmozhi C, Sankar R, Karupiah V, Sampathkumar P. L-asparaginase production by mangrove derived *Bacillus cereus* MAB5: Optimization by response surface methodology. Asian Pac J Trop Med. 2011; 4(6): 486-91.
7. Singh Y, Srivastava S, editors. L-asparaginase Production by a new isolate *Bacillus aryabhattai* strain ITBHU02 in solid state culture. 1st International Conference on Biosciences and Bioengineering: A collaborative Approach; 2012; 3(9): 150-68.
8. Kumar NM, Ramasamy R, Manonmani H. Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. Ind Crops Prod. 2013; 43: 150-8.
9. Shukla S, Mandal SK. Production Optimization of Extracellular L-asparaginase through solid-state fermentation by isolated *Bacillus subtilis*. Int J Appl Biol Pharm. 2012; 4(1): 219-26.
10. El-Bessoumy AA, Sarhan M, Mansour J. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. J Biochem Mol Biol. 2004; 37(4): 387-93.
11. Moorthy V, Ramalingam A, Sumantha A, Shankaranaya RT. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus* sp. Afr J Microbiol Res. 2010; 4(18): 1862-7.
12. Dharmaraj S. Study of L-asparaginase production by *Streptomyces noursei* MTCC 10469, isolated from marine sponge *Callyspongia diffusa*. Iran J Biotechnol. 2011; 9(2): 102-8.
13. Mishra A. Production of L-asparaginase, an anticancer agent, from *Aspergillus niger* using agricultural waste in solid state fermentation. Appl Biochem Biotechnol. 2006; 135(1): 33-42.
14. Narayana KJ, Kumar KG, Vijayalakshmi M. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. Indian J Microbiol. 2008; 48(3): 331-6.

Isolation and optimization of Asparaginase producing bacteria in solid state fermentation by Plackett-Burman design

Seyedi Abhari S^{1,2}, Shahriarinour M^{1,2*}, Anvari M², Azizi Jalilian F³

¹Biology/Microbiology Dept., Guilan Science and Research Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R. Iran; ²Biology/Microbiology Dept., Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R. Iran; ³Microbiology Dept., Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R. Iran.

Received: 7/Mar/2015 Accepted: 4/Jun/2016

Background and aims: In this study was carried out solid substrate fermentation to evaluate a variety of solid substrates in the production of asparaginase enzyme isolated strain of *Bacillus* from LAKAN region of Gilan.

Methods: In this experimental study, the screening of bacteria producing L-asparaginase of was used by M9 medium. For screening of different substrates in the solid bed, rice bran, rice stalks, wheat bran and wheat stalks as carbon sources and yeast extract, peptone, asparagine and tryptone as nitrogen sources were used. To optimize the culture medium and the effect of carbon and nitrogen sources on the production of enzymes asparaginase using Plackett-Burman total of 12 experiments were designed on two levels. Then, the enzyme production was evaluated by changing the factors affecting the production in a variety of solid substrates.

Results: As the best solid substrate, rice bran and the best source of nitrogen, asparagine showed the greatest effect on enzyme production. The best production of the enzyme in 1.5% (w/w) rice bran concentration and 0.5% (w/w) asparagine concentration was achieved 69.24 U/g in 30°C for 72h.

Conclusion: In the current study, the rate of enzyme production increased substantially using rice bran as carbon source in the solid state fermentation after optimizations conditions rather than not to optimized conditions.

Keywords: Optimization, Asparaginase enzyme, Rice bran waste, Solid state fermentation.

Cite this article as: Seyedi Abhari S, Shahriarinour M, Anvari M, Azizi Jalilian F. Isolation and optimization of Asparaginase producing bacteria in solid state fermentation by Plackett-Burman design. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(4): 125-134.

***Corresponding author:**

Biology/Microbiology Dept., Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R. Iran.
Tel: 00989359310560, E-mail: mahdi.shahriari@iaurasht.ac.ir